

B/ 1637  
CFW

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail in an envelope addressed to:

Commissioner for Patents, P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313 on March 25, 2005

CLAIM OF PRIORITY UNDER 35 USC §119  
Examining Group 1637  
Patent Application  
Docket No. G-069US02CIP  
Serial No. 09/777,280

Frank C. Eisenschenk  
Frank C. Eisenschenk, Ph.D., Patent Attorney

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Examiner : Joyce Tung  
Art Unit : 1637  
Applicants : Yves Fouillet, Claude Vauchier, Jean-Frederic Clerc, Christine Peponnet,  
Patricia Claustre, Raymond Charles, Nicolas Sarrut  
Serial No. : 09/772,280  
Filed : January 29, 2001  
Conf. No. : 9257  
For : Method for Carrying Out a Biochemical Protocol in Continuous Flow in a  
Microreactor

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

CLAIM OF PRIORITY UNDER 35 USC §119

Sir:

Applicants in the above-identified patent application hereby reaffirm their claim to the right of priority granted pursuant to 35 USC §119 based upon FR Application No. 99/11652, filed September 17, 1999; FR Application No. 99/12317, filed October 1, 1999; and FR Application No. 99/09806, filed July 28, 1999.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

As required by the Statute, certified copies of the French applications are being submitted herewith. Applicants request these certified copies of the foreign priority applications be made of record in the subject application pursuant to MPEP 201.14(b).

Respectfully submitted,



Frank C. Eisenschenk, Ph.D.

Patent Attorney

Registration No. 45,332

Phone No.: 352-375-8100

Fax No.: 352-372-5800

Address: P.O. Box 142950  
Gainesville, FL 32614-2950

FCE/sl

Attachments: Certified copies of priority documents FR 99/11652, FR 99/12317, and FR 99/09806

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 07 FEV. 2005

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Planche', is written over a horizontal line.

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
[www.inpi.fr](http://www.inpi.fr)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **28 JUIL 1999**  
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **9909806**  
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75 INPI PARIS**  
DATE DE DÉPÔT **28 JUIL. 1999**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

BREVATOME  
3, rue du Docteur Lancereaux  
75008 PARIS

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande  
de brevet européen

☐ demande initiale

☐ brevet d'invention

☐ différé

☒ immédiat

Établissement du rapport de recherche

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

**PROCEDE ET DISPOSITIF PERMETTANT DE REALISER EN FLUX CONTINU UN  
PROTOCOLE DE TRAITEMENT THERMIQUE SUR UNE SUBSTANCE.**

n° du pouvoir permanent 7068 du B 13376-3/JL 01 53 83 94 00  
12/06/98 DD 1972

date

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

Forme juridique

COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE  
Etablissement public de Caractère Scientifique,  
Technique et Industriel

Nationalité (s) Française

Adresse (s) complète (s)

31,33 rue de La Fédération 75752 PARIS 15ème

Pays

France

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

J. LEHU  
422-5/S002

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI


DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 2.  
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif)		B 13376.3/JL DD 1972	
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		99.09806 du 28.07.99	
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum) PROCEDE ET DISPOSITIF PERMETTANT DE REALISER EN FLUX CONTINU UN PROTOCOLE DE TRAITEMENT THERMIQUE SUR UNE SUBSTANCE.			
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE 31/33 rue de la Fédération 75752 PARIS 157ème			
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b> (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		FOUILLET	
Prénoms		YVES	
Adresse	Rue	Chemin des carrières Le Chevalon de Voreppe	
	Code postal et ville	38340	VOREPPE
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		VAUCHIER	
Prénoms		Claude	
Adresse	Rue	2 impasse Lartigues	
	Code postal et ville	38120	SAINT-EGREVE
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		CLERC	
Prénoms		Jean-Frédéric	
Adresse	Rue	8 rue du Mont Perthuis Le Fontanil-Cornillon	
	Code postal et ville	38120	SAINT EGREVE
Société d'appartenance (facultatif)			
<b>DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) PARIS LE 14 JUIN 2000  J. LEHU 422-5 S/002			

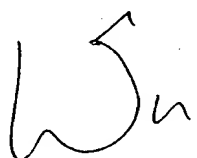
DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2 / 2  
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif)		B 13376.3/JL DD 1972	
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		99.09806 du 28.07.99	
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum) PROCÉDE ET DISPOSITIF PERMETTANT DE REALISER EN FLUX CONTINU UN PROTOCOLE DE TRAITEMENT THERMIQUE SUR UNE SUBSTANCE.			
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE 31/33 rue de la Fédération 75752 PARIS 157ème			
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b> (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		PEPONNET	
Prénoms		Christine	
Adresse	Rue	5 Square des Sarcelles	
	Code postal et ville	91250	TIGERY
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) PARIS LE 14 JUIN 2000  J. LEHU 422-5 S/002			

PROCEDE ET DISPOSITIF PERMETTANT DE REALISER EN FLUX  
CONTINU UN PROTOCOLE DE TRAITEMENT THERMIQUE SUR UNE  
SUBSTANCE

5    Domaine technique

La présente invention concerne un procédé et un dispositif permettant de réaliser en flux continu un protocole de traitement thermique sur une substance.

10    Elle se rapporte en particulier au domaine de l'analyse biologique ou chimique. Elle peut aussi se rapporter à la modification de paramètres physiques d'une substance.

15   Etat de la technique antérieure

La réalisation en flux continu d'un protocole de traitement thermique sur une substance peut soulever un certain nombre de problèmes. C'est le cas en particulier des protocoles biologiques incluant des étapes de cycles thermiques.

20    A titre d'exemple, dans le domaine de l'analyse génétique, on utilise très largement le procédé de réaction de polymérisation en chaîne ou PCR (de l'anglais Polymerase Chain Reaction). Ce procédé utilise les propriétés physico-chimiques de l'ADN.

25    L'ADN est une macromolécule composée d'un enchaînement de 4 nucléotides différents (A, C, G, T). Les 4 nucléotides sont capables de s'apparier 2 à 2 (A:T et G:C). On parle de complémentarité. Deux brins complémentaires sont capables de s'hybrider et de se séparer successivement à l'infini. L'état double ou simple brin dépend des conditions de pH, de température.... C'est cette capacité d'hybridation et de dénaturation (séparation) successives qui est

30  
35

utilisée au cours de la réaction de PCR (réaction de polymérisation en chaîne).

Dans la nature, lors de la division cellulaire, l'ADN est dupliqué de façon à assurer la transmission de l'information génétique. La synthèse de cet ADN est assurée par des enzymes. Il s'agit des ADN polymérases. A partir d'un brin d'ADN matrice, elles incorporent en face de chaque nucléotide celui qui lui est complémentaire, créant ainsi un nouveau brin d'ADN. C'est l'élongation. Pour réaliser cette synthèse, il faut fournir à la polymérase en plus de la matrice et des désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP), une amorce qui permettra d'initier la polymérisation. Cette amorce est un court fragment d'ADN (une vingtaine de nucléotides environ) complémentaire d'une extrémité du fragment d'ADN matrice. Pour obtenir une séquence d'ADN déterminée, il faut deux amorces : une sur chaque brin, de part et d'autre du fragment que l'on veut amplifier.

Le procédé PCR exploite les capacités de dénaturation et d'hybridation de l'ADN ainsi que l'élongation par une polymérase. Il utilise le principe suivant. L'ADN est dénaturé par chauffage à 94°C de façon à séparer complètement les deux brins d'ADN et pour éliminer les structures secondaires. Ensuite, l'amorce est hybridée sur le simple brin en abaissant la température (à environ 55°C) afin de permettre l'appariement spécifique. On obtient alors l'élongation d'un brin d'ADN en se plaçant à la température optimale d'activité de la polymérase thermostable, soit 72°C. Après ces trois étapes qui constituent un cycle, on procède à une nouvelle dénaturation. L'ADN néo-synthétisé va servir à son tour de matrice. Les cycles de traitement thermique sont répétés 20 à 30 fois. L'augmentation de la quantité de matrice est exponentielle.

D'autres techniques d'amplification dérivées du procédé PCR nécessitent des traitements faisant intervenir des cycles de températures. On peut citer le procédé RT-PCR, le procédé PCR allèle spécifique, etc... On connaît également les techniques de LCR (Ligase Chain Reaction) et les techniques dérivées. On peut également citer les réactions de séquençage cyclique à partir de clones ou de réaction PCR. On peut encore citer les réactions de microséquençage cyclique.

Différents dispositifs ont été conçus pour mettre en œuvre les protocoles biologiques incluant des étapes de cycles thermiques.

Dans un type de dispositif connu, l'échantillon biologique est placé dans un réservoir qui est porté successivement aux températures requises pour obtenir les traitement thermiques désirés. Certains dispositifs utilisent un système de thermostatisation par effet Peltier. Le temps de réponse thermique de ces dispositifs est de l'ordre de 3°C/s. La méthode utilisée par ces dispositifs est simple à mettre en œuvre mais il en résulte des temps de cycle très longs pour réaliser l'ensemble du protocole. Cette solution ne permet pas d'augmenter les vitesses des réactions.

L'article "Silicon microchambers for DNA amplification" de J. H. DANIEL et al., Sensors and Actuators A 71, 1998, pages 81-88, décrit une technique de ce type dans un réservoir ouvert, gravé dans un substrat de silicium. Le chauffage du réservoir est obtenu par une résistance électrique formée par un dépôt de platine. Le refroidissement du réservoir est obtenu par conduction permanente sur une plaque froide. Pour améliorer le temps de réponse thermique lors des cycles de température, le réservoir (ou chambre de

réaction) est suspendu par des poutres en silicium réalisées par gravure chimique dans le substrat. Le temps de réponse thermique est supérieur à la dizaine de degrés par seconde (de 15 à 40°C/s). La technique  
5 utilisée est cependant difficilement compatible avec la notion de laboratoire sur puce où le principe est de faire circuler des liquides entre différentes réactions biologiques. En particulier, il n'est pas possible de travailler à flux continu de liquide biologique.

10 Dans un autre type de dispositif connu, des micro-canaux permettant de faire circuler des fluides biologiques sont micro-usinés sur un substrat de silicium, de verre ou de matériau polymère. Ces micro-canaux ou capillaires permettent de faire circuler en  
15 permanence des échantillons. Le fluide traverse successivement des zones à températures fixées suivant les traitements thermiques nécessaires. Cette solution conduit à réaliser les micro-canaux sous forme de serpentins. Une telle solution est décrite par  
20 M.U. KOPP et al. dans "Continuous flow PCR on a chip", Proceedings of the  $\mu$ TAS'98 Workshop, Banff, Canada, 13-16 octobre 1998, pages 7-10, Ed. Kluwer Academic Publishers.

La figure 1 illustre un dispositif de ce  
25 type. Il s'agit d'une vue de dessus d'un substrat dans lequel un micro-canal 1, représenté de manière figurée, a été formé. Le micro-canal 1 forme un serpentín entre un orifice d'entrée 2 et un orifice de sortie 3. Les références 4, 5 et 6 représentent des zones soumises à  
30 des températures  $T_1$ ,  $T_3$  et  $T_2$  respectivement, par exemple 94°C, 72°C et 55°C respectivement. Le serpentín comporte des sections actives dans lesquelles le fluide à traiter subit le cycle dénaturation-hybridation-élongation, ces sections actives alternant avec des

sections passives servant à ramener le fluide dans la zone à température de dénaturation.

Un inconvénient majeur de cette disposition est qu'elle impose des limites rédhibitoires à la miniaturisation. En effet, il est nécessaire de disposer d'autant de zones thermiques qu'il y a de températures différentes dans un cycle thermique. De plus, chaque zone thermique doit être séparée d'une distance suffisante d'une autre zone thermique afin de garantir une température uniforme dans les zones isothermes. Un autre obstacle à la miniaturisation est dû au nombre de boucles du serpentin qui correspond au nombre de cycles thermiques désirés (typiquement 20 à 30 cycles pour le procédé PCR). La miniaturisation implique une diminution de la largeur des canaux, ce qui pose des problèmes fluidiques (risques de bouchage, pertes de charge). De plus, à débit de liquide imposé, les vitesses d'écoulement deviennent importantes, ce qui oblige à augmenter les dimensions des zones thermiques. En effet, la longueur d'une zone de chauffe doit être égale au temps de la réaction multiplié par la vitesse du liquide.

Le document GB-A-2 325 464 divulgue encore un autre type de dispositif. Dans ce dispositif, la chambre de réaction comporte une pluralité de micro-canaux parallèles, ayant une entrée commune et une sortie commune. Le fluide à traiter passe dans la chambre de réaction et est soumis à trois températures différentes, soit dans trois zones séparées, soit dans une même zone. Le dispositif n'est pas conçu pour travailler en flux continu puisque le fluide est maintenu à l'arrêt durant les étapes du procédé. Au mieux, la circulation du fluide peut être reprise durant l'étape d'élongation. Cette solution implique des moyens séquentiels de mise en circulation du fluide

assez complexes et qui doivent être parfaitement coordonnés avec les cycles de température.

Aucun des dispositifs de l'art connu ne permet de traiter une substance par un protocole thermique à flux continu de substance circulant et en  
5 ayant le meilleur compromis entre les paramètres suivants :

- surface active minimale pour le dispositif,
- 10 - débit de substance traitée maximum (volume de réaction par unité de temps),
- section de canal maximale pour une surface interne des canaux minimale.

#### 15 Exposé de l'invention

La présente invention permet de remédier aux inconvénients des dispositifs de l'art antérieur décrit ci-dessus.

20 Un premier objet de l'invention consiste en un procédé permettant de réaliser en flux continu un protocole de traitement thermique sur une substance, caractérisé en ce qu'il consiste à faire circuler ladite substance dans une zone portée successivement à  
25 des températures définies pour soumettre ladite substance à au moins un cycle de température pendant sa circulation dans ladite zone.

Avantageusement, la circulation de la substance dans ladite zone se fait selon un chemin  
30 rectiligne.

Ladite zone peut être portée successivement à des températures définies grâce à des moyens de chauffage et grâce à des moyens de refroidissement.

Le cycle de température peut être choisi  
35 pour obtenir une réaction de polymérisation en chaîne

(PCR) sur de l'ADN, pour obtenir une réaction chimique de ladite substance, ou pour obtenir une modification d'au moins un paramètre physique de ladite substance.

Un deuxième objet de l'invention consiste  
5 en un dispositif permettant de réaliser en flux continu un protocole de traitement thermique sur une substance, caractérisé en ce qu'il comprend :

- des moyens permettant la circulation de ladite substance dans une zone du dispositif,
- 10 - des moyens pour porter successivement ladite zone à des températures définies pour soumettre ladite substance à au moins un cycle de températures pendant sa circulation dans ladite zone.

Avantageusement, les moyens permettant la  
15 circulation de la substance dans ladite zone du dispositif comprennent au moins un canal rectiligne possédant un orifice d'alimentation en ladite substance et un orifice d'évacuation de ladite substance.

De préférence, le dispositif comporte un  
20 premier élément et un deuxième élément fixés l'un à l'autre selon des faces de contact, la fixation desdits éléments entre eux définissant ledit canal. Selon une première variante, l'un des éléments présente une gravure réalisée à partir de sa face de contact pour  
25 définir ledit canal, l'autre élément servant d'élément de fermeture. Selon une deuxième variante, lesdits éléments présentent chacun une gravure réalisée à partir de leur face de contact et destinée à venir en correspondance l'une avec l'autre lors de la fixation  
30 des deux éléments l'un à l'autre afin de constituer ledit canal.

Avantageusement, les moyens pour porter  
successivement ladite zone à des températures définies comprennent des moyens de chauffage et des moyens de  
35 refroidissement. Les moyens de chauffage peuvent être

choisis parmi des éléments rapportés (accolés, collés ou déposés) et des éléments intégrés au dispositif.

5 Au moins l'un desdits éléments peut être constitué par une plaquette de matériau semi-conducteur. Dans ce cas, les moyens pour porter successivement ladite zone à des températures définies peuvent comprendre des moyens de chauffage constitués par des zones dopées de la plaquette de matériau semi-conducteur, ces zones dopées pouvant être connectées à  
10 une source de courant de chauffage.

Les moyens de chauffage peuvent aussi être constitués par des dépôts conducteurs pouvant être connectés à une source de courant de chauffage. L'eau et l'air peuvent aussi être utilisés comme moyen de  
15 chauffage.

Les moyens pour porter successivement ladite zone à des températures définies peuvent comprendre des moyens de refroidissement. Ces moyens de refroidissement peuvent comprendre des circulations de  
20 fluide, par exemple de liquide thermostaté ou encore d'air. Ils peuvent aussi comprendre tout autre moyen, par exemple un moyen utilisant l'effet Peltier.

#### Brève description des dessins

25

L'invention sera mieux comprise et d'autres avantages et particularités apparaîtront à la lecture de la description qui va suivre, donnée à titre d'exemple non limitatif, accompagnée des dessins  
30 annexés parmi lesquels :

- la figure 1, déjà décrite, illustre un dispositif de réalisation en flux continu de protocoles de traitement thermique pour une application biologique, selon l'art connu ;

- la figure 2 illustre, de manière schématique, un dispositif permettant de réaliser en flux continu un protocole de traitement thermique sur une substance selon l'invention ;

5       - la figure 3 est un diagramme montrant l'évolution de la température en fonction du temps de la zone de traitement thermique du dispositif selon l'invention ;

10       - la figure 4 illustre, de manière schématique, un dispositif à plusieurs canaux qui est une variante de la présente invention ;

      - la figure 5 illustre, de manière schématique, un dispositif selon la présente invention associé à des dispositifs amont et aval ;

15       - la figure 6 illustre, de manière schématique, l'association en série de deux dispositifs selon l'invention pour réaliser deux protocoles thermiques distincts ;

20       - la figure 7 illustre, de manière schématique, l'utilisation d'un dispositif selon la présente invention pour appliquer un protocole thermique à un mélange réalisé en amont du dispositif ;

25       - la figure 8 est une vue en perspective d'un dispositif selon la présente invention réalisé à partir de la gravure d'un substrat de silicium.

#### Description détaillée de modes de réalisation de l'invention

30       La suite de la description va porter, à titre d'exemple, sur la réalisation d'analyseurs biologiques ou chimiques permettant d'effectuer des traitements thermiques cycliques sur des échantillons.

35       La figure 2 est une vue de dessus d'un dispositif selon l'invention dont on n'a représenté que

les éléments nécessaires à la compréhension de l'invention. Une vue plus détaillée d'un dispositif selon l'invention sera donnée plus loin.

Le dispositif de la figure 2 comprend un canal ou conduit 10 pourvu d'un orifice d'alimentation 11 et d'un orifice d'évacuation 12. Le canal 10, destiné à véhiculer un fluide à traiter thermiquement, peut être usiné dans un substrat de silicium, de verre, de quartz ou de matériau polymère. Il peut aussi être constitué d'un tube capillaire. Il est situé dans une zone 13 dont on contrôle les variations de température.

La zone 13 est par exemple soumise à un cycle de température caractéristique du procédé PCR tel que celui représenté à la figure 3. Selon ce cycle de température, la zone 13 est soumise à la température supérieure  $T_1$  pendant une durée déterminée, puis à une température inférieure  $T_2$  pendant une durée déterminée, ensuite à une température intermédiaire  $T_3$  pendant une autre durée déterminée. Un autre cycle peut alors débuter lorsque la zone 13 est soumise à nouveau à la température  $T_1$ .

Le fluide circulant dans le canal 10 en flux continu peut ainsi subir un nombre de cycles de température déterminé. Un échantillon de ce fluide peut par exemple subir, entre son entrée dans la zone 13 et sa sortie de la zone 13, 30 cycles de température  $T_1$ - $T_2$ - $T_3$ .

Comme le montre la figure 4, un dispositif selon l'invention peut comprendre plusieurs canaux 21, 22, ... traversant une même zone de traitement thermique 20. Dans ce cas, chaque canal possède un orifice d'alimentation en fluide particulier et un orifice d'évacuation de fluide particulier. En utilisation, on peut se servir d'un seul canal parmi la totalité, de plusieurs canaux ou de tous les canaux

simultanément, chaque canal étant lui-même un réacteur indépendant.

A un dispositif à simple canal ou à multiples canaux selon l'invention, on peut associer d'autres zones à température fixe, c'est-à-dire constante dans le temps, en amont ou en aval du dispositif. Ainsi, la figure 5 montre un dispositif présentant une zone à variation de température 30, du type de celui de la figure 4, comportant des canaux 31, 32, etc. En amont de la zone 30, les canaux traversent une zone 41 portée à une température constante. En aval de la zone 30, les canaux traversent une zone 42 portée à une température également constante. Cette association permet de commencer et de finir le protocole de réactions à des températures imposées et constantes dans le temps.

La réalisation de plusieurs protocoles cycliques distincts peut se faire par mise en série d'autant de dispositifs élémentaires selon l'invention. C'est ce que montre la figure 6. La partie A de la figure 6 montre l'association en série de deux dispositifs élémentaires à canaux multiples présentant des zones à variation de température 40 et 50. La partie B de la figure 6 montre que les zones 40 et 50 de chaque dispositif élémentaire sont chacune soumises à des protocoles thermiques différents.

Un ensemble comportant des zones à températures fixées (comme pour la figure 5) et des zones à températures variant selon un cycle (comme pour la figure 6) peut également être intégré sur un même support ou substrat.

Le dispositif selon l'invention peut inclure un système de mélangeur ou de séparateur en amont ou en aval de la zone à variation de température. La figure 7 illustre un dispositif selon l'invention

comportant, en amont de la zone à variation de température 60, un mélangeur 61 constitué par la jonction d'un premier canal 62 véhiculant un premier fluide et d'un deuxième canal 63 véhiculant un deuxième fluide. Après le mélangeur 61, le deuxième canal 63 véhiculant le mélange de fluides traverse la zone à variation de température 60.

La figure 8 représente, en vue éclatée, un dispositif à quatre canaux selon la présente invention. Il est constitué par le scellement de deux plaques 70 et 80 effectué selon des faces de mise en contact respectivement 71 et 81. Les plaques 70 et 80 peuvent être en matériau semi-conducteur, en verre ou en plastique.

Des rainures rectilignes 72, 73, 74 et 75 peuvent être obtenues par gravure chimique de la plaque 70 ou par une autre méthode d'usinage. La plaque 80 sert d'élément de fermeture pour les rainures afin de constituer des canaux. Elle comporte des ouvertures 82 et 82', 83 et 83', 84 et 84', 85 et 85' venant en vis-à-vis des extrémités des rainures respectivement 72, 73, 74 et 75.

L'assemblage des plaques 70 et 80 peut se faire par scellement direct ou par une autre technique de collage.

L'ensemble constitué par les plaques 70 et 80 scellées peut être placé sur une plaque chauffante 90 dont on contrôle les cycles de température. Ce contrôle peut être obtenu par l'une quelconque des techniques connues : effet Peltier, effet Joule, rayonnement, convection, conduction. Il est possible d'intégrer les moyens de chauffage directement sur l'une des deux plaques 70 et 80. Ainsi des résistances chauffantes peuvent être prévues sur l'une des plaques

et l'ensemble peut être placé sur une source froide pour évacuer la chaleur.

Il est avantageux d'utiliser des plaques en silicium. Ce matériau est un bon conducteur thermique, ce qui donne des temps de réponse en température très courts. De plus, les techniques du micro-usinage du silicium sont largement connues et permettent de contrôler parfaitement les dimensions des canaux. A titre d'exemple, la largeur des canaux peut être de 100  $\mu\text{m}$  mais peut aller de quelques dizaines de  $\mu\text{m}$  à quelques centaines de  $\mu\text{m}$ , par exemple 600  $\mu\text{m}$ . Leur longueur peut faire plusieurs centimètres.

Le nombre de cycles thermiques que subit un liquide est fonction du temps de passage de ce liquide au travers de la zone thermique. Il peut être important de bien contrôler les débits de liquide dans les canaux. Un bon contrôle peut être facilement obtenu par un pousse-seringue.

L'invention permet de modifier facilement les durées des différentes étapes sans avoir à modifier le dispositif ou le mode de thermostatisation. Les durées de ces étapes peuvent être modifiées en agissant sur le débit du fluide à traiter.

Des débits très lents peuvent être utilisés puisque la longueur du canal véhiculant le fluide peut être très courte. Ceci apporte beaucoup d'avantages notamment lorsque le fluide est déplacé par pression car les pertes de charge sont beaucoup plus faibles.

## REVENDECATIONS

1. Procédé permettant de réaliser en flux continu un protocole de traitement thermique sur une substance, caractérisé en ce qu'il consiste à faire circuler ladite substance dans une zone (13,20,30,60) portée successivement à des températures définies pour soumettre ladite substance à au moins un cycle de température pendant sa circulation dans ladite zone.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la circulation de la substance dans ladite zone se fait selon un chemin rectiligne.

3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que ladite zone est portée successivement à des températures définies grâce à des moyens de chauffage et grâce à des moyens de refroidissement.

4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le cycle de température est choisi pour obtenir une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sur de l'ADN.

5. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le cycle de température est choisi pour obtenir une réaction chimique de ladite substance.

6. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le cycle de température est choisi pour obtenir une modification d'au moins un paramètre physique de ladite substance.

7. Dispositif permettant de réaliser en flux continu un protocole de traitement thermique sur une substance, caractérisé en ce qu'il comprend :

- des moyens (10) permettant la circulation de ladite substance dans une zone (13) du dispositif,

- des moyens pour porter successivement ladite zone à des températures définies pour soumettre ladite substance à au moins un cycle de températures pendant sa circulation dans ladite zone.

5 8. Dispositif selon la revendication 7, caractérisé en ce que les moyens (10) permettant la circulation de la substance dans ladite zone (13) du dispositif comprennent au moins un canal rectiligne possédant un orifice d'alimentation (11) en ladite  
10 substance et un orifice d'évacuation (12) de ladite substance.

9. Dispositif selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comporte un premier élément (70) et un deuxième élément (80) fixés l'un à l'autre  
15 selon des faces de contact (71,81), la fixation desdits éléments entre eux définissant ledit canal (72,73,74,75).

10. Dispositif selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'un (70) des éléments présente  
20 une gravure réalisée à partir de sa face de contact (71) pour définir ledit canal (72,73,74,75), l'autre élément (80) servant d'élément de fermeture.

11. Dispositif selon la revendication 9, caractérisé en ce que lesdits éléments présentent  
25 chacun une gravure réalisée à partir de leur face de contact et destinée à venir en correspondance l'une avec l'autre lors de la fixation des deux éléments l'un à l'autre afin de constituer ledit canal.

12. Dispositif selon la revendication 7, caractérisé en ce que les moyens pour porter  
30 successivement ladite zone à des températures définies comprennent des moyens de chauffage et des moyens de refroidissement.

13. Dispositif selon la revendication 12,  
35 caractérisé en ce que les moyens de chauffage sont

choisis parmi des éléments rapportés (90) et des éléments intégrés au dispositif.

14. Dispositif selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'au moins l'un des éléments (70,80) est constitué par une plaquette de matériau semi-conducteur.

15. Dispositif selon la revendication 14, caractérisé en ce que les moyens pour porter successivement ladite zone à des températures définies comprennent des moyens de chauffage constitués par des zones dopées de la plaquette de matériau semi-conducteur, ces zones dopées pouvant être connectées à une source de courant de chauffage.

16. Dispositif selon la revendication 7, caractérisé en ce que les moyens de chauffage sont constitués par des dépôts conducteurs pouvant être connectés à une source de courant de chauffage.

17. Dispositif selon la revendication 9, caractérisé en ce que les moyens pour porter successivement ladite zone à des températures définies comprennent des moyens de refroidissement.

1/5

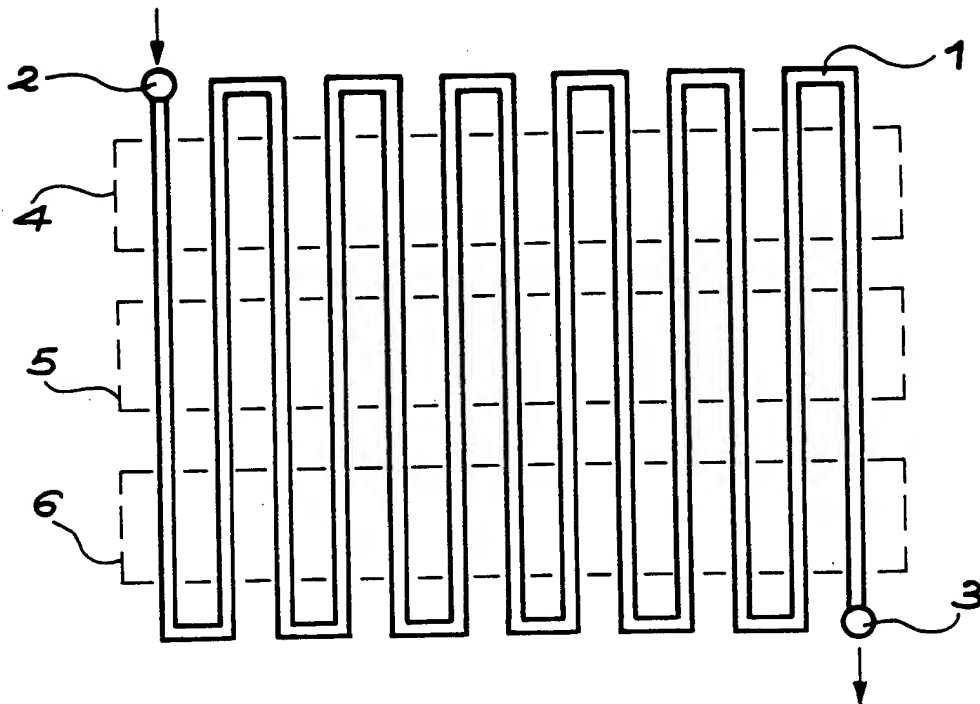


FIG. 1

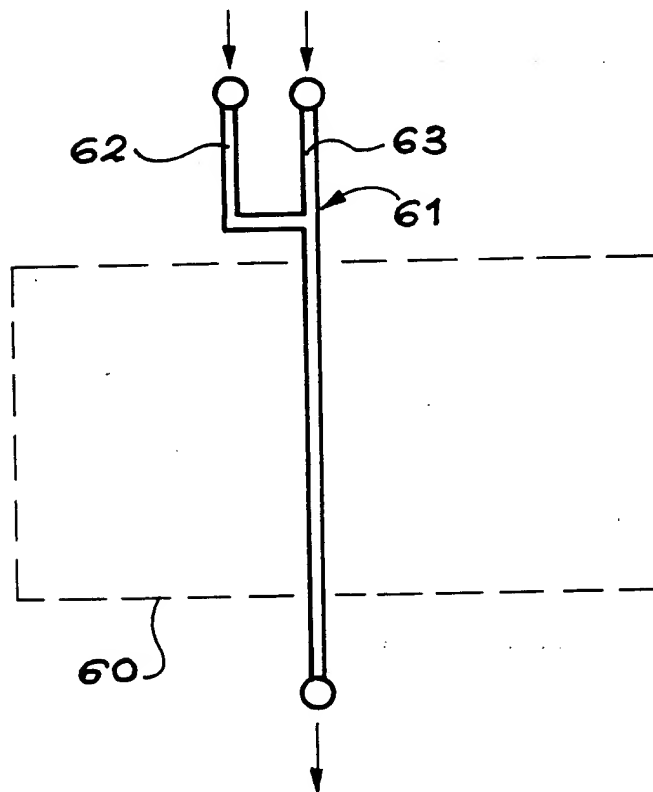


FIG. 7

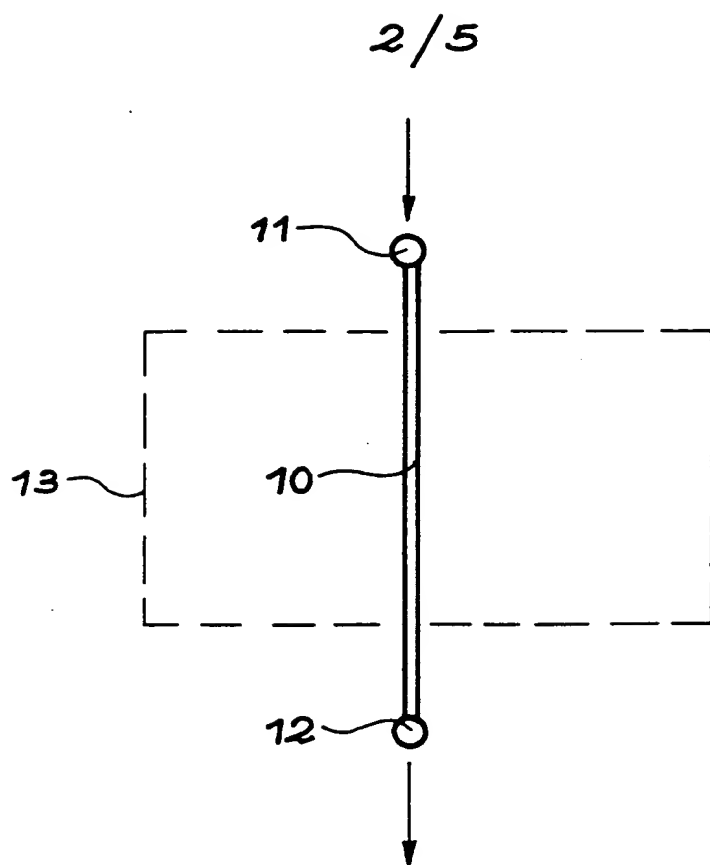


FIG. 2

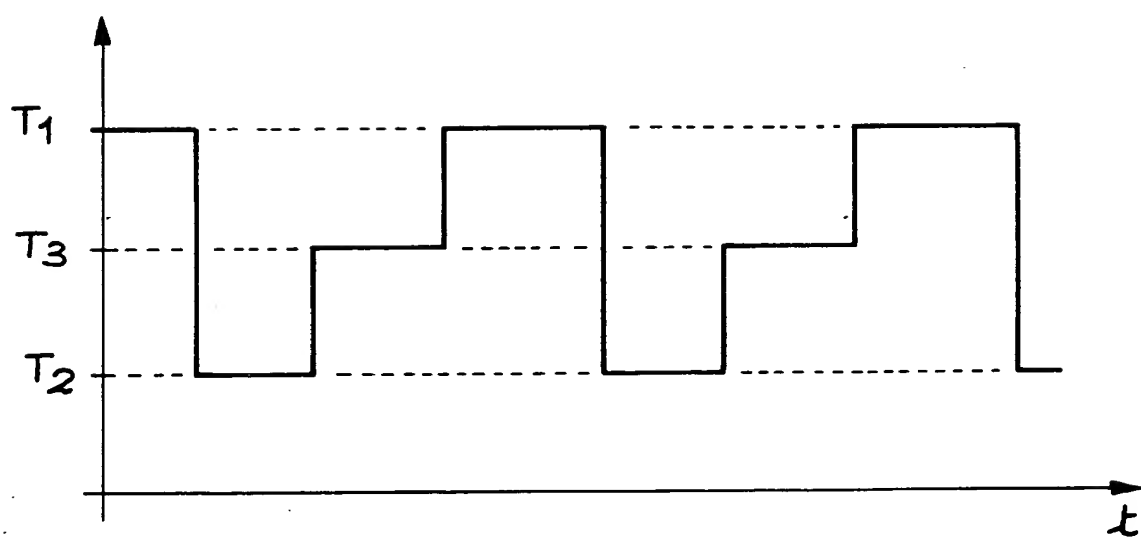


FIG. 3

3/5

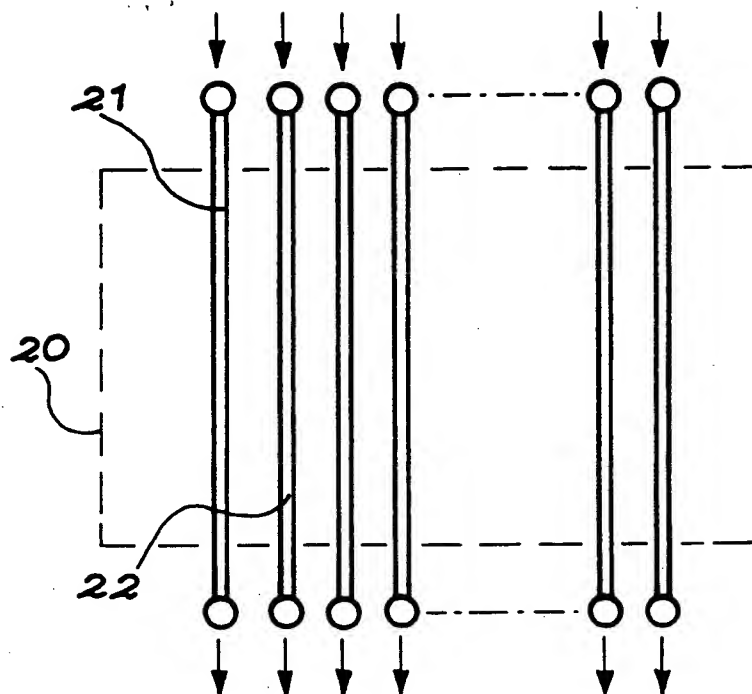


FIG. 4

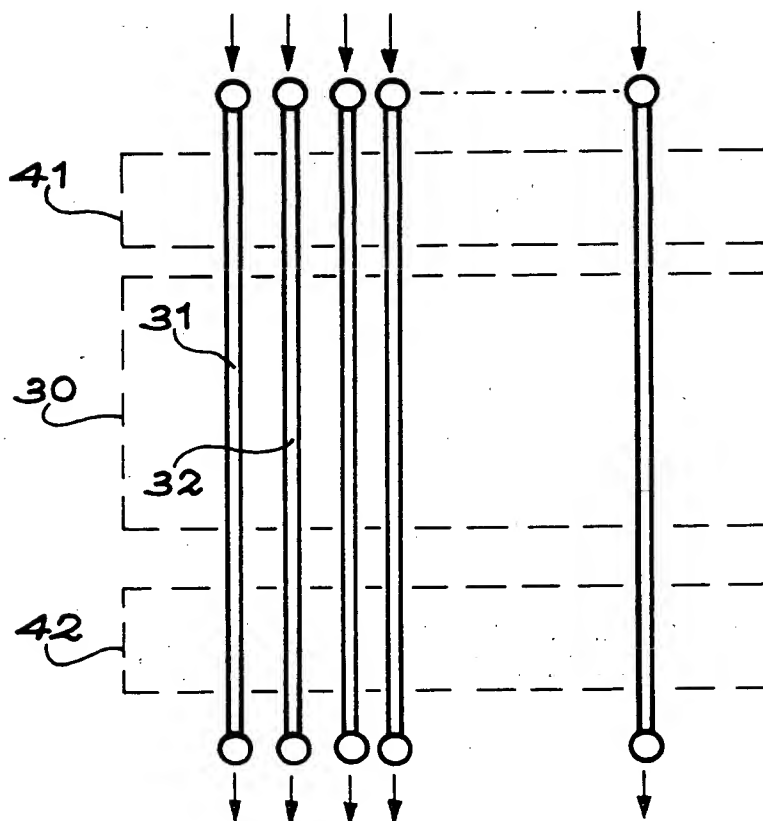


FIG. 5

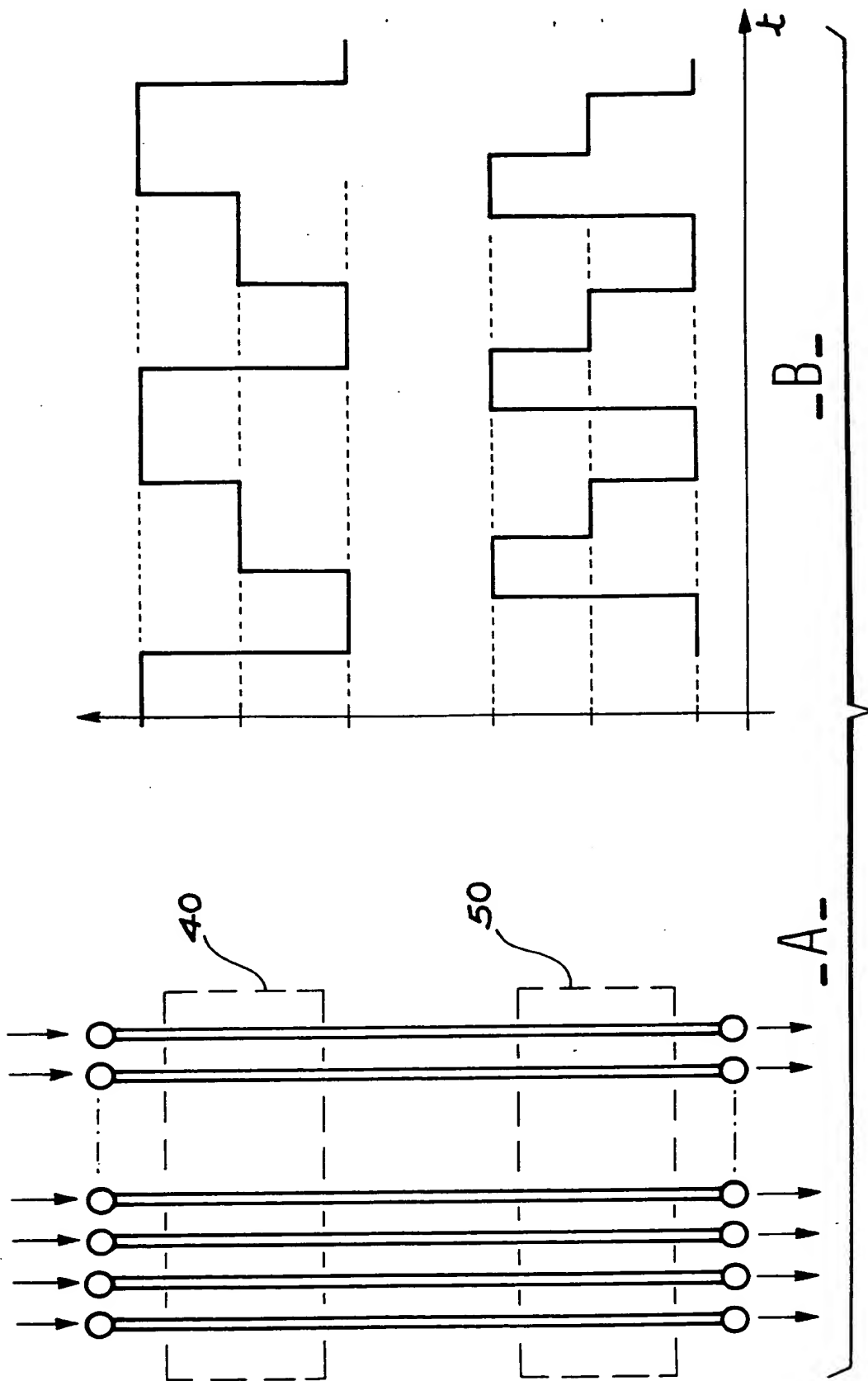


FIG. 6

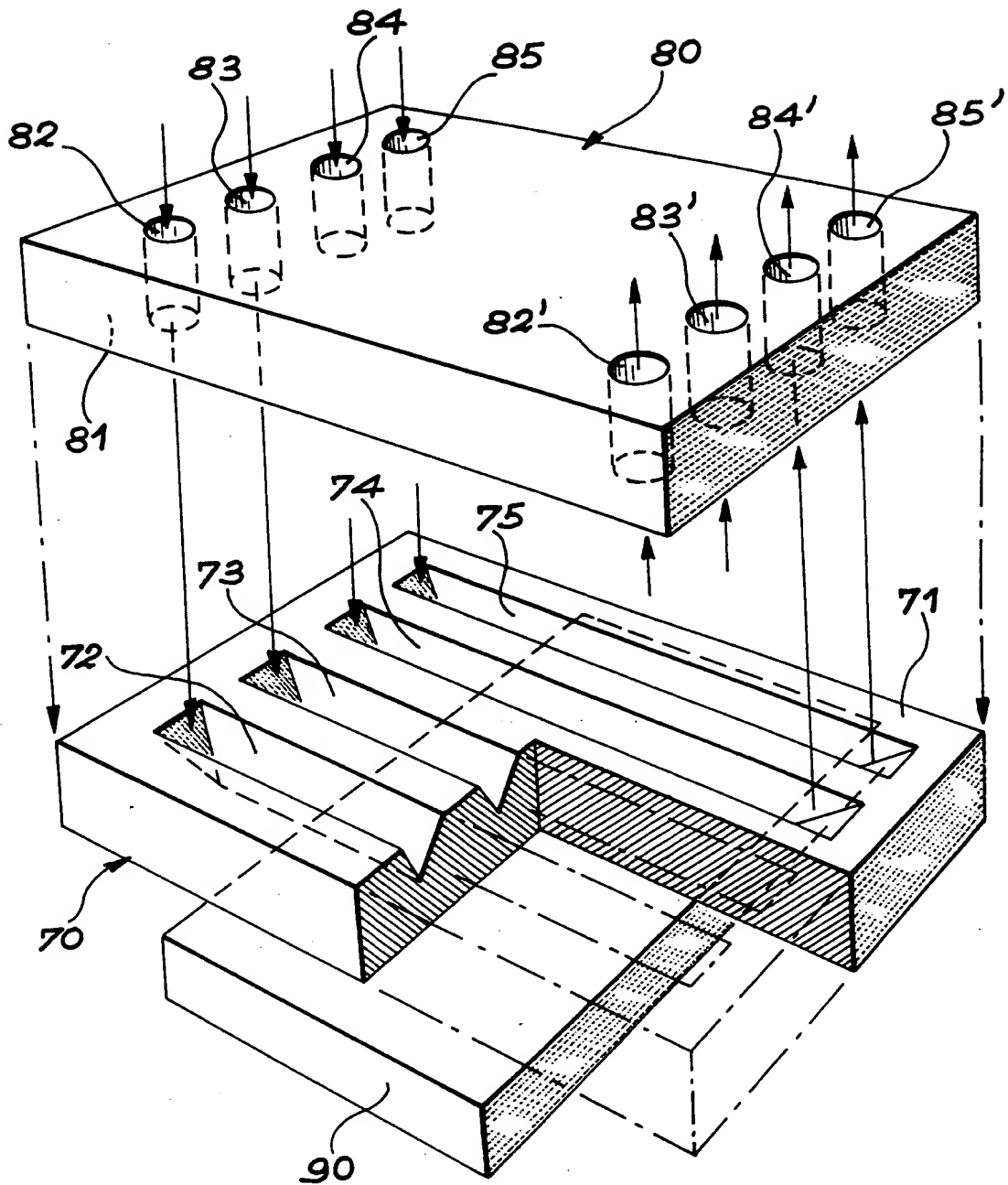


FIG. 8